

# 哺乳动物卵母细胞成熟和受精中 细胞骨架重组和作用

苏静艳 李树峰 严云勤\*

(东北农业大学生命科学学院细胞生物学实验室, 哈尔滨 150030)

**摘要** 卵母细胞成熟和受精是动物生殖过程的核心环节。细胞骨架是遍布于卵母细胞胞质中的一种复杂的蛋白质纤维网络, 研究表明, 卵母细胞成熟和受精过程中伴随着广泛的胞质骨架重组。哺乳动物卵母细胞和早期胚胎中细胞骨架具有其独特的分布和功能, 使卵母细胞和胚胎呈现出不同的变化特点。微丝、微管的分布变化与卵母细胞成熟和受精中遗传物质的重组密切相关。近年来, 对哺乳动物不同物种间卵母细胞和胚胎中细胞骨架成分的研究取得了很大的进展, 结合这些研究成果, 对哺乳动物卵母细胞成熟和受精过程中细胞骨架的重组、分布和作用进行了介绍。同时, 对多种信号转导途径参与卵母细胞成熟和受精中细胞骨架系统的调控也作了探讨。

**关键词** 卵母细胞成熟; 受精; 微丝; 微管; 信号转导

哺乳动物卵母细胞发育停滞在第1次减数分裂前期的双线期, 即生发泡(germinal vesicle, GV)期。当卵母细胞恢复减数分裂时, 发生生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD), 继而染色体凝集, 组装成MI期纺锤体, 然后排出第一极体, 并阻滞在第2次减数分裂中期(MII期), 直到受精或孤雌激活后, 卵母细胞才突破MII期阻滞, 完成第2次减数分裂, 排出第二极体, 染色体重新去凝集, 形成原核。通常把从卵母细胞恢复减数分裂到MII期这一发育过程称为卵母细胞核成熟。受精是雌雄生殖细胞相结合形成合子的过程, 是个体生命的起点。

哺乳动物卵母细胞成熟和受精过程中, 伴有许多动态性事件以确保细胞的正常和充分发育。在这一过程中卵母细胞必须经历一系列的核和胞质变化以最终发育成具有受精能力和充分发育能力的细胞。核和胞质变化主要包括生发泡破裂、极体排放、精子穿入、雌雄原核形成、迁移及雌雄原核融合。有丝分裂的重新启动标志着胚胎发育的开始<sup>[1,2]</sup>。

卵母细胞成熟和受精过程中发生广泛的胞质骨架重组, 所有发育事件都高度依赖细胞骨架系统的调控, 如减数分裂恢复、染色体凝集、纺锤体形成、极体排放、精子穿入以及原核的形成和迁移等。细胞骨架是遍布于卵母细胞胞质中的一种复杂的蛋白质纤维网络, 其中微丝和微管是卵母细胞成

熟和受精中的两种主要细胞骨架成分。微丝是组成细胞皮层的肌动蛋白纤维网络, 使细胞表面具有应力并决定细胞形状和极性; 微管是细胞的一种支撑结构, 在减数分裂结构形成、染色体重组和胞质细胞器迁移中具有重要的作用<sup>[3]</sup>。同时, 卵母细胞成熟和早期胚胎的正常发育也与许多细胞骨架调控信号转导机制密切相关。

研究表明, 细胞骨架的重组对哺乳动物卵母细胞发育进程十分重要, 但目前对细胞骨架重组与卵母细胞减数分裂成熟和受精之间关系这一问题仍缺乏系统的研究, 本文主要对哺乳动物卵母细胞成熟和受精中细胞骨架的重组、作用及其参与细胞骨架调控的信号转导机制作一综述。

## 1 哺乳动物卵母细胞成熟过程中细胞骨架重组与分布

哺乳动物各个物种间卵母细胞发育模式相对保守, 细胞骨架分布呈现出一些共同的特点。研究表明, 在分裂间期, 长而相对稳定的微管散布于细胞质中, 但是在分裂中期, 微管变短、活跃组装并集中分布在纺锤体区域。哺乳动物卵母细胞成熟中

收稿日期: 2004-06-02 接受日期: 2004-08-25

\* 通讯作者。Tel: 0451-55190846, Fax: 0451-55190655, E-mail:

YanYunqin@sohu.com

微丝分布模式基本一致,生发泡期均一地散布于细胞质中,生发泡破裂后迅速向卵母细胞皮层集中;减数分裂纺锤体和极体形成时,微丝向纺锤体和极体聚集,推测这可能与维持纺锤体和中心体位于细胞周边位置有关<sup>[4,5]</sup>;卵裂球中也有微丝分布。同时,哺乳动物细胞骨架分布具有种属特异性。

### 1.1 生发泡期卵母细胞

哺乳动物生发泡期卵母细胞中染色体尚未凝集,微管和微丝形成遍布胞质的网络。小鼠和马生发泡期卵母细胞中呈现出广泛的,相对均一的胞质微管分布<sup>[6]</sup>。但小鼠中随着生发泡破裂的发生,胞质微管开始集中于生发泡边缘,并由此伸入胞质皮层,小鼠卵母细胞中这种微管分布模式的变化,在马卵母细胞中并不明显;大鼠中长的微管则无方向地散布在生发泡期卵母细胞中,在生发泡附近密集分布;而在有些物种,如猪中,生发泡期卵母细胞中检测不到微管<sup>[4]</sup>。

### 1.2 生发泡破裂后和MI期卵母细胞

随着生发泡破裂的发生胞质微管网络广泛重组,长的胞质微管被从凝集的染色体发出的短粗微管所代替。随后微管放射状延长形成清晰的MI期减数分裂纺锤体,凝集的染色体排列在纺锤体赤道面上。

### 1.3 后期I-末期I卵母细胞

卵母细胞成熟后期,微管纺锤体较MI期进一步延长,两组同源染色体开始分离。末期时,染色体分离完成,微管仅分布于已延长的减数分裂纺锤体中。

### 1.4 MII期卵母细胞

II期卵母细胞具组织完好的第2次减数分裂纺锤体和第一极体,染色体排列在纺锤体中央,微管分布于纺锤体和第一极体中,纺锤体周围形成一富含微丝区。第2次减数分裂纺锤体位于胞质边缘,第一极体中的微管不具可辨别的组织形态,为一团无定形物质,与染色质交织在一起。

减数分裂MI和MII期,纺锤体是主要的微管结构,大部分哺乳动物中纺锤体为约10 μm长的、具两极星体的对称桶状结构<sup>[4-8]</sup>,大鼠纺锤体则为锥形结构<sup>[11]</sup>。然而,啮齿类动物纺锤体较其他哺乳动物纺锤体要稍长一些,如仓鼠纺锤体长度为(16.4 ± 0.7) μm,小鼠纺锤体为(26.4 ± 0.3) μm,老化的小鼠卵母细胞中纺锤体长度减少<sup>[9]</sup>。

多数哺乳动物包括人在内,减数分裂期间纺锤

体的组装和去组装及其动态性变化都是相似的,尽管仍有一些种属特异性,如纺锤体形状和大小。两次减数分裂中,中期纺锤体的形成对于核分裂是必须的。

## 2 卵母细胞受精后细胞骨架重组与分布

受精后,卵母细胞中细胞骨架重组与分布变化显著,对受精中雌、雄原核的迁移、靠近及早期卵裂等起着重要作用。精子进入,激活卵母细胞,减数分裂恢复,纺锤丝牵拉赤道面上致密排列的母源染色体向纺锤体两极迁移。后期两染色体拉向两极,末期时,微管分布于两组已去凝集的母源染色体之间。大部分哺乳动物中,精子进入卵子后,精子头开始去凝集,在去凝集的精子颈部区域形成一个放射状的微管星体结构,并随着原核生长及迁移而增大,散布于细胞质中,精子头以后发育成雄原核<sup>[6,10]</sup>。研究表明,精子尤其是精子头部含卵母细胞激活因子,因此,精子和精子头部对卵母细胞激活和原核形成都是必须的<sup>[11]</sup>。受精以后,在原核形成的同时,胞质中重新形成微管,雌雄原核分别由父源性和母源性微管区围绕,这些微管均锚定在位于两微管区之间的微丝结构上。在雌雄原核相向移动、靠近时父源性和母源性微管区结合,集中分布在雌雄原核之间的区域,同时微丝围绕微管分布。微丝与微管间的相互作用可能在父源性和母源性两个微管区的融合中起重要作用<sup>[12,13]</sup>。原核核膜破裂后,微管重新在凝集的染色体周围集中,长度明显缩短。

在2-4细胞胚胎中,微管形成微管网络散布于子细胞胞质中,在间期细胞核去凝集的染色质周围分布尤为突出。微丝集中于子细胞皮层和卵裂沟处,但细胞核周围微丝分布差异较大<sup>[2,6,8]</sup>。

不同哺乳动物物种中,胞质微管骨架组装有所不同。啮齿类动物由散布在卵母细胞胞质中的微管星体形成胞质微管,胞质星体随着原核的发育体积增大,在胞质中微管蛋白聚集到原核表面而形成浓密的基质,使原核相互靠近。与此相反,其他哺乳动物体外成熟的卵母细胞中,微管集中于纺锤体区域,没有胞质微管组织中心<sup>[4-6]</sup>,受精时,精子中心体产生精子星体,组织胞质微管组装,协调雌雄原核的迁移、融合及减数分裂纺锤体的形成。因此,可能啮齿类动物微管组织中心对受精后原核迁移和启动细胞周期减数分裂有重要作用,受精后雌

雄原核的迁移是受母源中心体物质调控的<sup>[14]</sup>，而在其他大部分哺乳动物中这一机制则依赖于来自精子的父源性中心体。现有研究认为，马与小鼠同样，卵母细胞中含有足够的母源性成分，形成功能性中心体，组装纺锤体<sup>[8]</sup>。这些观察结果说明，不同动物卵子中，纺锤体形成的控制可能依赖于不同机制。但无论是哪种微管组装形式，随着雌雄原核的形成，由精子中心体或胞质星体发射出的微管都迅速充满细胞质，包绕雌雄原核。

关于中等纤维在胚胎发生中的形成、分布和作用，目前存在许多争议。一些研究者认为中等纤维蛋白在细胞致密化和胚泡形成时才出现，由胚胎基因合成；但也有研究证实在许多哺乳动物卵母细胞中即存在中等纤维，而这些中等纤维则是母源性的，在卵子发生中合成。同样，对中等纤维在卵母细胞中分布排列情况的研究也存在分歧，大部分研究表明中等纤维在卵母细胞中形成高度交联的网络，由一层或多层蛋白质包被，称为“细胞骨架片层”(cytoskeletal sheets)<sup>[15]</sup>。

受精后，细胞中的中等纤维“细胞骨架片层”结构在时间和空间上都发生剧烈的动态性变化。受精前“细胞骨架片层”从卵母细胞皮质区排出；卵母细胞激活后45~50 min，“细胞骨架片层”又重新进入细胞皮层，插入到皮层细胞骨架中，而不是直接与细胞质膜连接。同时，大部分面性“细胞骨架片层”在受精前呈明显的旋涡状排列；受精后45~50 min完全转变成线性排列构象<sup>[16]</sup>。

### 3 细胞骨架的作用及其调控

#### 3.1 微丝

在哺乳动物卵母细胞成熟和受精过程中，微丝对于减数分裂器位置的维持、减数分裂器的旋转、受精锥的形成、极体形成和排放、原核迁移及胚胎卵裂等都具有重要作用。

哺乳动物卵子皮层由两种不同的网络组成：疏松的肌动蛋白网络和致密的非肌动蛋白网络。受精时疏松的微丝网络与精子头部和尾部紧密结合，表明这种微丝网络对正常受精是必须的<sup>[17]</sup>；但在皮质颗粒锚定到细胞皮层中则可以没有微丝的作用<sup>[18,19]</sup>。另外，皮质微丝网络也与纺锤体装置相关，对牛、羊和啮齿类动物卵的紫外分析表明纺锤体装置附着于皮质微丝网络。促微丝解聚药物细胞松弛素 B (CB)处理卵母细胞可抑制正常的染色体迁移和极体

排放，说明微丝在控制减数分裂纺锤体旋转、维持其位于细胞周边位置、极体排放及胞质分裂中起重要作用，但其机制尚未完全阐明<sup>[20-22]</sup>。

微丝在成熟卵母细胞皮质颗粒由细胞内部向皮层迁移过程中也起着积极作用。卵母细胞成熟期间，皮质颗粒由微丝驱动向细胞外周运动，迁移到临近质膜的位置，但第2次减数分裂纺锤体所在位置除外<sup>[19,23]</sup>。研究表明，细胞松弛素 B 处理小鼠或仓鼠卵可明显阻断由精子进入诱导的皮质颗粒释放，促微丝稳定药物也同样可阻止人工激活小鼠卵母细胞皮质颗粒外排，说明在小鼠和仓鼠中皮质颗粒外排需要微丝的作用<sup>[21,22]</sup>。然而，微丝并不参与猪卵母细胞皮质颗粒外排<sup>[19]</sup>。

第二极体的形成也高度依赖于完整的微丝网络。研究认为，至少有两种不同的信号转导通路对第二极体形成时的微丝网络进行调控：蛋白激酶 C- $\alpha$ (PKC- $\alpha$ )信号启动第二极体排放；钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II(CaMKII)控制排出极体<sup>[24,25]</sup>。对于这两种蛋白激酶是否直接作用于微丝网络形成第二极体，还有待于进一步实验证实，但已有研究表明，受精时这两种激酶是通过直接作用于微丝网络或通过肌动蛋白结合蛋白对第二极体形成起作用的。近年来对于 PKC 在哺乳动物卵子孤雌活化中的作用研究较多，虽然获得了一些公认的结果，但仍存在许多争议。在小鼠和仓鼠的研究中发现，PKC 激活促进细胞周期恢复和原核形成，但皮质颗粒释放与 PKC 无关<sup>[26]</sup>。另有报道，PKC 激活诱导小鼠和仓鼠卵的细胞骨架变化，但不能激发减数分裂恢复<sup>[27]</sup>。目前认为，卵丘细胞中 PKC 的激活促进卵母细胞恢复减数分裂，而卵母细胞中 PKC 的激活抑制其自身的成熟。关于 PKC 是否参与正常受精过程的研究，目前存在很大争议。早期研究认为 PKC 在正常受精中不起作用，但 Gallicano 等<sup>[24]</sup>研究发现 PKC 激活是小鼠受精时减数分裂恢复、第二极体形成和雌雄原核发育形成合子核必需的，并且发现 PKC 活性升高的时间正好与第二极体形成的时间一致，PKC 在空间上主要分布于第二极体区域的质膜上，这些预示着 PKC 激活在第二极体形成方面可能起十分重要的作用。Francione 等<sup>[28]</sup>也报道，小鼠精子诱导的卵子激活和原核形成可被钙感光蛋白(calphostin)C 阻断，该发现支持 PKC 在正常受精过程中起重要作用。

#### 3.2 微管

卵母细胞成熟和受精过程中，细胞骨架的组织

和结构发生了一系列明显的变化。大量研究表明,微管对于哺乳动物卵母细胞两次减数分裂的完成、精子的运动以及受精过程中雌、雄原核的结合都是必不可少的。

两次减数分裂(MI、MII)中-后期转化(metaphase-anaphase transitions)中,由微管形成纺锤体分离同源染色体到第一极体和第二极体中,受精后与单倍体精子染色体结合,形成合子。近年来,许多人对调控微管纺锤体M期转化(M-phase transition)的信号通路进行了研究。M期转化是由胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度升高引起的,Ca<sup>2+</sup>浓度升高激活或抑制胞内一系列信号级联反应,这些信号包括受精后失活的细胞静止因子(CSF)<sup>[29]</sup>、周期蛋白(cyclins)、由受精激活的蛋白激酶C(PKC)、钙调蛋白依赖的蛋白激酶II(CaMKII)及通过受精作用被激活或被抑制的促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)<sup>[30]</sup>。

MAPK和CaMKII是纺锤体中-后期转化必须的两种激酶,它们都直接与纺锤体相关,依靠胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高来调节其活性。CaMKII是参与卵母细胞减数分裂的重要分子,在卵母细胞成熟、极体排放、受精和活化等过程中发挥作用。未受精卵中,CaMKII与减数分裂纺锤体紧密相连。受精后,胞内Ca<sup>2+</sup>浓度随即升高,钙调蛋白与CaMKII共定位在纺锤体上;精子入卵后,CaMKII、ATP、Ca<sup>2+</sup>及钙调蛋白共同驱动纺锤体向后期构像转变<sup>[31]</sup>。

MAPK信号通路在卵母细胞减数分裂周期进程和受精中起着关键作用。对小鼠、大鼠和山羊卵母细胞成熟过程中MAPK作用的研究表明,MAPK激活发生在生发泡破裂之后,与减数分裂启动无关,仅参与生发泡破裂后继事件,尤其是对微管活动和染色体行为的调节。而在猪、牛、马等动物中,MAPK激活与生发泡破裂同时发生,直接参与减数分裂启动。微管蛋白和微管结合蛋白MAP-2、MAP-4及tau均是MAPK的靶分子,MAPK通过使这些蛋白质磷酸化而调节微管重组。生发泡破裂后,微管在逐步致密化的染色体周围聚集,最终形成纺锤体。MAPK对微管重组和纺锤体形成起重要作用。MII期卵母细胞中,活性MAPK定位于减数分裂纺锤体上,与CaMKII位置相近<sup>[32]</sup>,暗示这两种分子之间存在非常密切的相互作用;细胞质中也同时存在大量没有活性的MAPK,它们与纺锤体装置无关。活性MAPK可维持卵母细胞停滞在MII期;而MAPK失活则是受精或孤雌激活后原核形成的先决

条件。另外,MAPK在受精过程中也起着非常重要的作用,与第二极体排放、精核去致密、微管组装形式、染色体行为和原核形成等都密切相关。最新实验表明,活性CaMKII可能直接或间接与活性MAPK作用,可能CaMKII能够增强MAPK活性,抑制其降解<sup>[33]</sup>;由于活性MAPK与原核核膜不相容,可抑制原核形成,因此CaMKII的功能可能是维持MAPK活性,阻止原核提前形成。

此外,胞质微管网络对卵母细胞正常受精和合子形成也是必须的,主要是在雌雄原核迁移中起作用,目前对合子中细胞骨架信号调控机制研究较少。

### 3.3 中等纤维

关于中等纤维“细胞骨架片层”在受精中为何会经历剧烈的变化和中等纤维在其中的作用目前尚不清楚,有研究认为由PKC/PKM(蛋白激酶M是蛋白激酶C的催化亚基)信号转导途径对其进行调控<sup>[16]</sup>。

## 4 展望

细胞骨架对哺乳动物卵母细胞正常发育和受精起着十分重要的作用,但与体细胞中细胞骨架系统的研究比较而言,对卵母细胞和早期胚胎中细胞骨架组装和功能的研究仍缺乏系统性,尚需进一步加强。在过去多年的研究中,借助于对细胞周期调控研究所取得的成果,以及生化分析与胚胎学的结合,使人们得以在分子水平上描述参与调节卵母细胞成熟和受精中细胞骨架系统的信号途径。多种信号转导途径精密调节着卵母细胞成熟和受精等特殊细胞周期事件。随着科学技术手段的不断进步,哺乳动物卵母细胞和早期胚胎发育中,参与细胞骨架系统调控的细胞信号机制及一些新的成分和功能将被进一步揭示出来。对于细胞骨架及其信号转导调控机制在哺乳动物卵母细胞成熟和受精过程中的作用,尚有一些未阐明的问题,有待于进行更深入的研究,这将是当前细胞生物学和发育生物学研究的热点。

### 参考文献 (References)

- [1] Fan HY *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29: 708
- [2] Albertini DF *et al.* Nuclear and cytoplasmic changes during oocyte maturation. In: Bavister BD (ed.) *Precimplantation Embryo Development*, New York: Sero Symposia-USA Series, Springer-Verlag, 1993, 3
- [3] Alberts B *et al.* *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., New York: Garland Publishing, Inc.1994

- [4] Kim NH *et al. Mol Reprod Dev*, 1996, **43**: 248
- [5] Kim NH *et al. Hum Reprod*, 1998, **13**: 2217
- [6] Tremoleda JL *et al. Mol Reprod Dev*, 2001, **60**: 260
- [7] Goudet G *et al. Biol Reprod*, 1997, **57**: 232
- [8] Tremoleda JL *et al. BOR Papers in press. Published on March 19, 2003 as DOL: 10.1095/bioreprod.102.012823*
- [9] Eichenlaub-Ritter U *et al. Chromosoma*, 1986, **94**: 337
- [10] Schatten G. *Dev Biol*, 1994, **165**: 299
- [11] Meng L *et al. Hum Reprod*, 1997, **12**: 1062
- [12] Suzuki H *et al. J Reprod Dev*, 2002, **48**: 293
- [13] Suzuki H *et al. Microsc Res Tech*, 2003, **61**: 327
- [14] Hewitson L *et al. Biol Reprod*, 1997, **57**: 967
- [15] Carson DD *et al. Dev Biol*, 2000, **223**: 217
- [16] Gallicano GI *et al. Dev Biol*, 1995, **167**: 482
- [17] Webster SD *et al. Dev Biol*, 1990, **142**: 61
- [18] Connors SA *et al. Dev Biol*, 1998, **200**: 103
- [19] Sun QY *et al. Biol Reprod*, 2001, **64**: 879
- [20] Kim NH *et al. Zygote*, 1996, **4**: 145
- [21] DiMaggio AJ Jr *et al. Mol Reprod Dev*, 1997, **47**: 334
- [22] Terada Y *et al. Mol Reprod Dev*, 2000, **56**: 89
- [23] Sun QY *et al. Mol Reprod Dev*, 2001b, **59**: 192
- [24] Gallicano GI *et al. Mol Reprod Dev*, 1997, **46**: 587
- [25] Johnson J *et al. Dev Biol*, 1998, **204**: 464
- [26] Colonna R *et al. Mol Reprod Dev*, 1997, **48**: 292
- [27] Moore GD *et al. Dev Biol*, 1995, **170**: 519
- [28] Francione A *et al. Effects of protein kinase C inhibition on sperm-induced egg activation. In: Bat-Sheva Seminar on Physiological and Molecular Processes Leading to Fertilization in Mammals*, Zichron Ya'acov Israel, 1997, 61
- [29] Zernicka-Goetz M *et al. J Cell Sci*, 1995, **108**: 469
- [30] King RW *et al. Science*, 1996, **274**: 1652
- [31] Kim NH *et al. Mol Reprod Dev*, 1996, **43**: 513
- [32] Moos J *et al. Biol Reprod*, 1995, **53**: 692
- [33] Hatch KR *et al. Mol Reprod Dev*, 2001, **58**: 69

## Organization and Function of the Cytoskeleton during Mammalian Oocyte Maturation and Fertilization

Jing-Yan Su, Shu-Feng Li, Yun-Qin Yan\*

(Laboratory of Cell Biology, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract** Oocyte maturation and fertilization are the core processes of animal reproduction. Cytoskeleton is a complex network of protein filaments that extends throughout the oocyte cytoplasm. Accumulating evidence showed that extensive organizations of the cytoskeletal elements occur during oocyte maturation and fertilization. The cell cycle progression depends greatly on the regulation of the cytoskeleton. Recent studies show that the distribution of cytoskeleton in mammalian oocyte and embryo are very unique and have peculiar function, which enable the oocyte and embryo to undergo very remarkable changes found at developmental transitions. Further, organization of both microtubules and the microfilaments are involved in the organizations of genetic materials during oocyte maturation and fertilization. Recent years, there is a great progress in the studies of the cytoskeletal elements of oocyte and embryo in different mammalian species. This review mainly focuses on the organization, distribution and function of the cytoskeleton according to these researches. The regulation of many signal transduction mechanisms on cytoskeletal system during oocyte maturation and fertilization is also discussed.

**Key words** oocyte maturation; fertilization; microtubule; microfilament; signal transduction

Received: June 2, 2004 Accepted: August 25, 2004

\*Corresponding author. Tel: 86-451-55190846, Fax: 86-451-55190655, E-mail: YanYunqin@sohu.com